

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-502868

(P2002-502868A)

(43) 公表日 平成14年1月29日 (2002.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 7/48		A 6 1 K 7/48	4 B 0 6 5
7/00		7/00	K 4 C 0 8 3
			W
C 1 2 N 1/16		C 1 2 N 1/16	G
			A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-531148(P2000-531148)
 (86) (22) 出願日 平成11年2月3日(1999.2.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月11日(2000.8.11)
 (86) 国際出願番号 P C T / F R 9 9 / 0 0 2 2 0
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 0 8 9 6
 (87) 国際公開日 平成11年8月19日(1999.8.19)
 (31) 優先権主張番号 9 8 / 0 1 6 3 7
 (32) 優先日 平成10年2月11日(1998.2.11)
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 サノフィーサンテラボ
 S A N O F I - S Y N T H E L A B O
 フランス75013パリ、アヴニユ・ドゥ・フ
 ランス 174番
 (72) 発明者 カゼラ, ビエール
 フランス、エフ-34090 モンペリエ、リ
 ュ カール ヴォン リース、10
 (72) 発明者 ドロッコ, ジャン-マリ
 フランス、エフ-34570 ミュルヴィエル
 レ モンペリエ、リュ デ クローズ、
 6
 (74) 代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-6産生に刺激活性を有する化合物を含有する化粧用組成物

(57) 【要約】

本発明は、化粧製品用賦形剤と混合され、ケラチノサイ
 トによるIL-6産生を刺激する活性を有する化合物を少な
 くとも1つ含有する化粧用組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化粧品製剤に賦形剤と混合され、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する化合物を少なくとも1つ含有する化粧品組成物。

【請求項2】 微生物の発酵で得られる生成物である、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物を含有することを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、酵母から選択される微生物の発酵で得られる生成物であることを特徴とする請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、ロドトルラ菌株の発酵で得られることを特徴とする請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、番号1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体の発酵で得られることを特徴とする請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 番号1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002及びその生産変異体。

【請求項7】 発酵汁中でケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性が得られるまで、請求項6に記載の株が従来の条件下で発酵培地で培養されることを特徴とする、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出生成物を製造する方法。

【請求項8】 請求項7に記載の方法で得られる、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する組成物。

【請求項9】 バイオマスが、未改質形態又は濃縮形態で用いられる請求項7に記載の方法で得られる請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 刺激指数SIが1.2～6の、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を示すことを特徴とする請求項8に記載の組成物。

【請求項11】 バイオマスの抽出、溶媒と水の蒸発、及び化粧品での使用に適した溶媒中での乾燥抽出物の希釈で得られることを特徴とする請求項8～10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒトケラチノサイトによるインビボでのインターロイキン-6(IL-6)の産生を刺激できる活性化合物を含有する化粧品組成物に関する。

【0002】

細胞によって産生される広範囲なサイトカインのうち、IL-6合成の特異的な刺激は、美容術での使用に特に興味あるものである。IL-6は、細胞及び体液の免疫に対する活性化作用に加えて、表皮の再生機序において活性な役割を果たす。インビトロでは、IL-6はコラーゲン合成ならびにケラチノサイトと繊維芽細胞の増殖を刺激する。インビボでは、皮膚でIL-6が過剰発現しているトランスジェニックマウスで、角質層の肥厚が認められる。表皮表面層のこの増大はプロ炎症を発現せずに生じ、局部病変に対する皮膚の保護改善を反映しているものと考えられている。文献による一連のこのデータは、IL-6が表皮に引き起こされる損傷の修復を促進し、皮膚の老化を遅くしていることを示している。

【0003】

したがって、以下のものを参照することができる：K. Yoshisaki ら、Cytokine, 1990 2, 381-387; R.M. Grossman ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6367-6371; Kirbauer ら、J. Immunol., 1989, 142, 1922-1928; K. Turken ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 5068-5072; J. Taylor-Papadimitriou ら、Cell. Differ., 1982, 11, 169-180; L. Aarden ら、Lymphokines, 1985, 10, 175-182。まず、皮膚の老化において表皮で角質層が厚くなるが、表皮の生産は低下し、基底膜での細胞の凝集は改変されることが広く知られている。したがって、老化に抗う皮膚を助けるためには、表皮の肥厚をもたらすケラチノサイトの増殖を刺激できる活性化剤を皮膚に与えることが重要である。

第二に、真皮において、真皮の構造を構成する源となっている細胞、繊維芽細胞は、ますます活性を低下し、その結果、コラーゲン、エラスチン及びグリコサミノグリカン合成を低下する。同時に、光への暴露作用は、現存する真皮繊維の分解を促進する(化学線(actinic)老化)。この一連の作用は、真皮構造の組織を

の1つに記載の組成物。

【請求項12】 皮膚の老化を防止する化粧品組成物を製造するための、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する化合物の使用。

【請求項13】 化合物が、酵母の発酵で得られることを特徴とする、請求項12に記載の使用。

【請求項14】 化合物が、ロドトルラ株、特に番号1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体を用いて得られることを特徴とする請求項13に記載の使用。

【請求項15】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する化合物を製造するための、ロドトルラ株、特に番号1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体の使用。

【請求項16】 化粧品で用いる賦形剤中の、IL-6産生に刺激活性を有する化合物の化粧品に有効な量が表皮に用いられることを特徴とする化粧品の処法。

破壊し、弾性、かたさ(firmness)及び張りといった機械的性質を皮膚から奪い、こうしてしわの出現を促進する。

【0004】

この結果、老化作用に対抗するには、繊維芽細胞を刺激して、その環境を復元するために繊維芽細胞を助ける活性化剤を皮膚に与えることが重要である。有用なものとするには、この作用は、繊維の崩壊に関する酵素活性、特にコラーゲナーゼの増加を同時に伴うべきではない。また、皮膚本来の機能を変えるべきでもない。

ここで、インビボでヒトケラチノサイトによるIL-6産生を刺激できる成分又は抽出物は、化粧品組成物の製造に使用できる「活性化剤」を構成することが見出された。より詳細には、インビボでヒトケラチノサイトによるIL-6産生を刺激できる化合物を含有する化粧品組成物は、皮膚組織の再構成に使用できるが、皮膚本来の機能を妨げないことが見出された。ヒトケラチノサイトを介してIL-6の刺激活性を有する化合物(以降、「活性化剤」と呼称する(欠文))は、ケラチノサイト増殖を刺激する(ケラチノサイトでのIL-6のオートクリン作用、文献に記載)作用自体を誘導できることが示されている。

さらに、ヒトケラチノサイトを介してIL-6に刺激活性を有する化合物は、繊維芽細胞での作用を介して、この細胞の皮膚環境の張りの増強を誘導できることが分かっている。これらの化合物は、コラーゲナーゼ活性を増さずに、コラーゲン繊維数をわずかに増し加える。

【0005】

したがって、本発明の第一の主題は、化粧品賦形剤とインビボで混合されるヒトケラチノサイトによりインターロイキン-6産生を刺激できる化合物を含有する化粧品組成物に関する。

化粧品組成物に含有される、IL-6産生に刺激活性を有する化合物、つまり活性化剤は、非ペプチド化合物、ペプチド、植物由来の細胞もしくは組織の抽出物、又は微生物(例えば細菌もしくは真菌、より詳細には酵母)の発酵で得られる生成物であってもよい。

ケラチノサイトによるインターロイキン-6産生に刺激活性を有する抽出物を得

る方法とともに、株SEBR 2002の性質を以下に記載する。

【0006】

株

発見

本発明のこの特定の態様によれば、ヒトケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物を産生する生物は、Loiret(フランス)の油採掘地から採取された油田の水の試料から単離された酵母株で、内部番号SEBR 2002と指定された。この微生物の試料は、パスツール研究所のC.N.C.M.に1997年2月11日に寄託され、I 1844の表示で登録された。

この微生物の生化学的特性は、BioMerieuxにより市販されているAPI 50 CH ギャレリエ(gallerie) (糖に特異的)及びYT バイオロジカル試験(Biolog Inc, USA)により市販、酵母に特異的)で決定した。この結果、この微生物は担子菌(Basidiomycete)科のロドトルラ(Rhodotorula)属に属していることが決定された。

それは、多形性の中温性酵母である。それは、YPG(酵母ペプトングルコース寒天)培養培地で28℃で十分に発育する。コロニーの色は、オレンジがかったピンク色である。

この生物は、ミヌタ(minuta)種に関連づけられる性質を示す。

【0007】

番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているこの酵母株ロドトルラ種及びその生産変異体も、本発明の主題を成す。

この新規な株の単離は、少量の試料水を種々の濃度に希釈し、栄養寒天培地を含むベトリ皿の表面に少量の各希釈液を塗布することからなる従来法によって行った。微生物が発育できる28℃で数日間培養後、種々のコロニーを個々に試料とし、より多くの培養物が得られるように栄養寒天で継代培養する。

栄養寒天培地で培養し、興味ある株の大量かつ純粋な培養物が得られる幾つかの連続的な継代培養で培養した後、ストック株の保存バッチ0、ついで一次及び二次のシードバッチを製造する。

こうして、栄養寒天培地でのベトリ皿の培養物を原料として、回収培地を用いて酵母懸濁液を調製する。回収培地は、凍結保存中の微生物の生育力を確実に良

し、バイオマスを増大させる最初の工程、及び産出のための第二工程を実施するのが有利である。この後者の場合、第一工程には1〜2日の期間で十分である。

培養物のバイオマス抽出物に含有されるヒトケラチノサイトによるIL-6産生の刺激活性は、SI_{IL-6} (SI)と呼ばれる刺激指数又は刺激因子によって示される。これは、抽出物による誘導で生じるIL-6量の、測定される基底(非誘導)値に対する比の形成によって算出される：

【0011】

【数1】

$$SI_{IL-6} = \frac{\text{誘導される IL-6 産生}}{\text{基底の IL-6 産生}}$$

【0012】

バイオマス抽出物は、SVK 14ケラチノサイトに対して、乾燥抽出物に対する最終濃度を1%でアッセイして、1.2〜6、好ましくは1.5〜4.5のSI値が生じる際に、活性であると評価される。

1リットルの培養によって、100倍希釈(1/100)に対して刺激指数が1.5〜4.5の抽出物を約10〜50ml得ることができる。

所望の活性は、フラスコ培養のバイオマスを抽出して得られるが、所望の活性を大量に得るためには、発酵槽の培養物を調製し、そのバイオマスを抽出することが有利であると思われる。

【0013】

発酵槽培養

発酵槽は、1〜2日経った攪拌フラスコ培養物を用いて接種する。培養物は、依然として指数成長期にあることが好ましい。

発酵槽中、用いられる培養条件によるが、活性は、培養後すぐの最初の数時間で認められる。しかし、抽出に進む前に、定常成長期に達するのを待つことが有利である。I 1844の発酵槽の培養によって、後述の培養条件、例えばpH及び通気をより良く制御することができる。

好にする凍結防止剤を含む。

【0008】

得られた酵母懸濁液は凍結チューブ(cryotube)に分け、-80℃で保存する。これらのチューブで、バッチ0を構成する。

バッチ0のチューブを原料とする以外は同じプロトコルにしたがって、一次シードバッチを調製する。

次いで、さらに同じプロトコルにしたがって、一次シードバッチの凍結チューブを原料として二次シードバッチを調製する。

シードバッチ0、1及び2の製造により、株、つまり所望の活性へのアクセス(access)が長期間保証される。

【0009】

方法

ヒトケラチノサイトによりIL-6産生に刺激活性を有する抽出物を製造する方法は、この新規な株I 1844又はその生産変異体を適当な培養条件で培地で培養し、次いで活性画分を抽出することからなる。

活性画分は、バイオマス又は上清中にあるてもよい。

発酵

株I 1844の培養は、いずれかの好気的な培養法で行うことができる。このため、発酵槽で一般的に用いられる種々のタイプの機械が用いられる。以下のアプローチは、特に方法の実施に採用することができる。

【0010】

フラスコ培養

ベトリ皿に接種されている二次シードバッチを用いて、2〜3日培養後に酵母懸濁液を得て、これを適当な培地を含有する攪拌三角フラスコでシードに用いる。また、攪拌フラスコに、シードバッチのチューブを用いて直接接種することができる。攪拌フラスコの培養は、1〜3日間続けることができる。

活性の産生は、ろ過又は有機溶媒との遠心分離によって得られるバイオマスを抽出することによって認められる。

フラスコでの最初の培養工程後すぐに、2つの連続的な培養工程：細胞を増殖

発酵槽で得られるケラチノサイトによる刺激活性は、使用される培養条件によって変化し得る。1リットルの培養物で、バイオマスの抽出後に、100倍希釈(1/100)に対するSIが1.5〜4.5の抽出物を約50ml得ることができる。

【0014】

培養条件

発酵法に用いられる培養培地は、同化され得る少なくとも1つの炭素源、同化され得る1つの窒素源及び無機元素類を含むべきである。同化され得る炭素源としては、例えば、グルコース、マンノース、マルトース、デキストリン、グリセロールのような炭水化物、アミノ酸及びタンパク質を使用することができる。

また、同化され得る炭素源としては、酢酸、スベリン酸、クエン酸、プロピオン酸、コハク酸及び2-ケトグルタル酸又は動物もしくは植物の油脂を用いることができる。

同化可能なもっとも良好な窒素源は、タンパク質、ペプトン及びアミノ酸から見出される。これらの源は、例えばカゼイン、ラクトアルブミンならびにグルテン、及びその加水分解物、魚粉、酵母エキスをペプトンからなる。

バイオマスの産生は、培養中にこれらの2つの重要な物質の一方又は他方を加えることによって、増加させることができる。

【0015】

微生物を確実に成長させ、かつ微生物の細胞による炭素源と窒素源の同化を最適化するために培養培地に加えられる無機元素には、カリウム、ナトリウム、鉄、マグネシウム、カルシウム又はマグネシウムの塩ならびにリン酸塩のようなリン化合物及び微量元素が挙げられる。

培養物を攪拌し、10〜60時間のあいだ通気させることによって、有利な結果を得ることができる。

好ましくは培養培地のpHはわずかに酸性の値に維持されており、最適培養温度は23〜38℃、好ましくは25〜33℃の範囲である。

培養条件、例えば培地の組成とpH、培養温度、攪拌速度及び発酵の通気は広範囲に変換ことができ、もっともよい結果が得られるように選択される。

【0016】

抽出

ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を示す活性抽出物の製造は、幾つかの抽出工程を要する。

最初の工程は、汁(must)の残りからバイオマスを分離することからなる。このために、遠心分離、接線マイクロろ過、回転ドラムろ過、又は発酵汁からバイオマスを分離するのに当業者によって通常使用されるいずれかの他の方法を用いることができる。次いで、バイオマスを溶媒混合物と数時間接触させることにより、疎水性の分子を抽出することができる。

接触に好ましい期間は一晚、つまり約15時間である。

次いで、バイオマスと充填された有機相を前口ろ過で分離し、バイオマスを廃棄する。

次に、乾燥抽出物が得られるまで、室温〜50℃の範囲の温度で、有機相を真空下で留去する。

【0017】

活性抽出物の調製

こうして得られる乾燥抽出物は、美容術で通常用いられる種々の溶媒中で採取することができる。

採取濃度は、抽出物を完全に溶解させ、かつその後の使用に合うように選択する。

ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物は、本発明に好ましい溶媒であるエタノール/水 50/50(v/v)混合物に、活性に従って乾燥抽出物を5〜10%の割合で入れる。溶液の代わりに粉末の製造が望まれる場合には、乾燥抽出物は、単に凍結乾燥させることができる。

得られた各抽出物のアリコートの一部について行われたケラチノサイトによるIL-6産生に対する刺激活性のアッセイにより、その活性を評価し、方法の再現性を確認することができる。

残りのバイオマスの完全に除き、かつその微生物の安定性を確実にするために、抽出物を除外固値が0.2μmの膜でろ過し、滅菌フラスコに無菌的に分ける。これらの溶液の無菌的な調製により、保存剤の添加を避けることができる。種々の

た。

生成物での培養

IL-6誘導のために、96ウェルの培養マイクロプレート中5×10⁴ 細胞/ウェルの密度で最終用量200μlで、細胞を3回接種する。95%の空気と5%のCO₂を含有する雰囲気中37℃で24時間培養後、培地を除き、示した濃度で生成物を含有するFCS 1%を有する同量の培地に取り替える。さらに18〜24時間培養した後、各トリプレットの培養上清を除き、ブルーし、サイトカイン含量の測定まで-20℃で凍結する。

【0020】

サイトカインアッセイ

IL-6、IL-1β、TNFα及びIL-8は、ELISAアッセイキット(R&D, Abington, UK)を用いて定量した。各上清は、製造者の指示にしたがって二回評価した。これらのアッセイの検出限界は、3pg/mlである。ELISA技術によるタンパク質の免疫学的アッセイに加えて、IL-6の活性型も、B9マウスハイブリドーマ細胞についての生物学的アッセイによって評価した(L. Aardenら、Lymphokines, 1985, 10, 175-182)。

結果の表現

結果は、分泌されたサイトカイン量の絶対値(ELISAアッセイについてはタンパク質のpg/ml又はIL-6のB9生物学的アッセイについてはU/ml; 1ユニットは、B9細胞増殖の最大作用の50%を誘導するサイトカイン量として定義する)、又は誘導されたサイトカイン産生と基底の産生との比:

【0021】

【数2】

$$SI_{IL-6} = \frac{\text{誘導される IL-6 産生}}{\text{基底の IL-6 産生}}$$

【0022】

として算出される上記の刺激指数SIのいずれかで示す。

生化学アッセイを行い、この新規な微生物I 1844由来抽出物がケラチノサイトによるIL-6産生に非常に価値のある刺激活性を有することが立証された。それらの力強い活性は、表皮に引き起こされた種々の損傷の修復と皮膚の老化の減速を予言する種々のアッセイで測定された。

ヒトケラチノサイトによるインビトロのIL-6合成に対するI 1844抽出物の刺激作用の特徴付けは、以下のようにして行った。

【0018】

I 1844抽出物及び使用した生成物

同様の条件で行った種々の発酵培養物から誘導された抽出物I 1844の種々の試料を用いた。試料は0.1g/乾燥抽出物gの濃度でエタノール/水 50/50(v/v)混合物に4℃で保存し、次いで使用時に所望の最終濃度に希釈した。

IL-6合成を誘導する基準生成物はSigma社のLPS(大腸菌055:B5)で、これをPBS中10mg/ml濃度で-20℃に保存した。LPS阻害剤であるポリミキシンBは、Sigma社より供給された。

生成物の希釈

生成物は、ケラチノサイトの培養培地で希釈した(以下参照)。別に示した以外は、上記のようにして調製したI 1844抽出物を、乾燥抽出物に対して1%の最終濃度で評価した。LPSは、10μg/ml濃度でアッセイした。

【0019】

評価モデル

細胞

用いたヒトケラチノサイト系はSVK 14系(J. Taylor-Papadimitriouら、Cell. Differ., 1982, 11, 169-180)であった。これは、4.5 g/gルコース、100mmolピルビン酸ナトリウム、50U/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシン及び10%ウシ胎児血清(FCS)を含有するDMEM培地での培養で維持した。比較として、フィコール(Ficoll(登録商標))グラジエントで精製し、健康者から得た正常なヒトリンパ球(PBMC)、ならびにA 431系由来のケラチノサイト(ATCC CRL 1555)及び胸腺形成手術由来の正常なヒトケラチノサイト(Biopredic, Rennes)を、上記と同じであるが、EGF 10 mg/mlとウシ下垂体抽出物 50μgを含有する培地で培養し

結果

IL-6産生に刺激活性を有する抽出物は、以降では単に「I 1844抽出物」と呼称する。各実験で用いた抽出物の数ならびにその濃度を示す。

ケラチノサイトIL-6刺激に対するI 1844抽出物の作用

I 1844抽出物は、濃度-依存様式でSVK 14-ケラチノサイトIL-6 合成を刺激する。産生される基底のIL-6の平均量 + 3 SD (11.8 + [3x0.8] = 13.6 pg/ml) を実際の(positivity)閾値とすると、I 1844抽出物は、0.12%領域(SI = 1.23)の濃度かそれより高い濃度でIL-6合成を有意に刺激し、EC₅₀は0.25%に等しく、かつ最大効果は、IL-6合成が2.3の力価(factor)で刺激される2%の濃度で得られる。

別のヒトケラチノサイト系(A 431系)ならびに正常なヒトケラチノサイトに、研究を拡張した。SVK 14系で認められたものと異なって、I 1844抽出物は、別のケラチノサイト系(A 431)と正常なケラチノサイトの一次培養物の双方で、2より大きい力価によってIL-6産生を刺激できる。

したがって、I 1844抽出物の作用は、系に限定されず、正常な細胞に一般化させることができる。

【0023】

I 1844抽出物の作用の特異性

I 1844抽出物の作用の特異性は、
- 作用が、IL-6産生の刺激能力が公知である細菌性LPSでの汚染にはよらなかったこと、及びIL-6も産生できるリンパ球由来の細胞がI 1844抽出物に非感受性であったこと、
- ケラチノサイトにより合成され得るサイトカインのうち、I 1844抽出物の影響下でのみ、IL-6産生が刺激されたこと、
を立証することによって、種々の段階で確認された。

LPS阻害剤であるポリミキシンの存在は、SVK 14-ケラチノサイトのIL-6産生に対するI 1844抽出物の誘導作用を改変しないが、LPS-誘導刺激は、この化合物によって必然的に阻害される。この結果は、I 1844抽出物で認められた作用が細菌の内毒素による汚染では引き起こされないことを示している。さらに、B9バイオ

アッセイで行われた評価は、I 1844抽出物が刺激するIL-6産生が生物学的に活性であることを示している。

【0024】

異なる細胞ターゲットについての比較研究は、血液リンパ球(PBMC)が、ケラチノサイトと異なっており、IL-6産生に対するI 1844抽出物の刺激活性作用に非感受性であることを示している。逆に、両タイプの細胞を刺激できるLPSは、両方の場合に有効である。したがって、この研究は、I 1844抽出物が、由来となるリンパ球細胞に影響を及ぼさずにケラチノサイトを刺激することを示している。

最後に、I 1844抽出物は、IL-1、IL-8又はTNF- α のレベルを同時に増さずに、IL-6合成を刺激する。サイトカインのうち、IL-8は、その走化性特性を介して好中球性の多核細胞を局部的に補充できるため、性質が特異的である。したがって、それは炎症で重要な役割を果たす。I 1844抽出物は、研究された他のサイトカインの産出を増さずにIL-6産生を刺激する。

この一連のデータ(LPS作用なし、ケラチノサイトとIL-6に限られた刺激のみをターゲット化)により、I 1844抽出物の作用が特異的で、かつプロ炎症作用のないことが結論づけられる。

【0025】

このように、I 1844抽出物は、ケラチノサイトIL-6産生を再現性があるように刺激する。この作用は、系として確立されているヒトケラチノサイトと一次培養物から誘導される正常なヒトケラチノサイトの双方に認められる。ケラチノサイトによりIL-6合成を刺激するI 1844抽出物の性質は、特異的である。それは、I 1844抽出物に固有の性質によるもので、細菌の内毒素のような外因性の汚染によるものではなく、由来のリンパ球細胞に影響を及ぼさず、試験されたサイトカインのうちIL-6についてのみ認められる。I 1844抽出物の特異性は、細胞と分子の両方で2倍である。ケラチノサイトのIL-6に対するI 1844抽出物の刺激活性作用の特徴づけにより、1.5~4.5のIL-6刺激指数が、SVK 14細胞について評価されたあらゆる試料についての活性基準として定義された。

コラーゲン繊維収縮に対するI 1844抽出物の作用の特徴づけは、以下のように行った。

、NUNC)に分け、37℃で培養する。ゲルは、10分以内に生じる。約2時間後、ゲルを皿の側面から外科用小刀を用いて剥がす。次いで、ミリメートルきざみの定規を用いて、形成から24、48及び72時間後にゲルの直径を測定する。

処置

I 1844抽出物は、最終濃度が0.1%、0.2%及び0.5%となるように、ゲルが生じる間に1.76xDMEM培地に希釈する。最終濃度6.4g/lのフェノール溶液を、収縮阻害の対照として用いる。

定量分析

I 1844抽出物は、0.1%濃度及びそれ以上の濃度で、収縮において著しい増大を誘導する。収縮阻害の対照として用いたフェノールでは、収縮は0%である。I 1844抽出物の存在下及び不在下で72時間後に収縮ゲルの定量分析を電子顕微鏡で観察したところ、細胞がタンパク質合成相において活性であることが示される。I 1844抽出物での処理は、繊維の数又は大きさを著しく変えないものと思われる。

I 1844抽出物は、0.1%及びそれより多い用量で有効である。それは繊維芽細胞の活性を増し、その活性は、コラーゲンゲルの収縮及びもっとも高い濃度のみでの繊維数の増大で示される。

コラーゲナーゼ活性化に対するI 1844抽出物の作用の特徴づけは、以下のように行った。

【0030】

この研究の目的は、コラーゲナーゼ活性化に対するI 1844抽出物の作用を試験することである。このために、繊維芽細胞とトリチウム化コラーゲンを混合して調製したコラーゲンゲルを用いる。この状況で、繊維芽細胞は再組織化して、コラーゲンを再構築し、収縮して、真皮タイプの構造を生じる。このため、繊維芽細胞はコラーゲナーゼを産生し、これを、プロテナーゼ作用で活性化され得る潜在性の形態で培養培地に放出する。コラーゲナーゼ活性は、トリチウム化コラーゲン基質を可溶性放射活性ペプチドに消化する能力によって測定する。潜在性コラーゲナーゼは、1,1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン(TPCK)で処理したトリプシンによって活性化される。用いた細胞系はMRC5株で、これはヒト初

【0026】

この研究の目的は、コラーゲン繊維の収縮に対するI 1844抽出物の作用を試験することである。繊維芽細胞とコラーゲンを混合して調製したコラーゲンゲルを用いる。細胞により発揮された緊張作用で、コラーゲンは繊維に組織化される。この現象を、ゲルの収縮によって定量する。

用いた細胞系はMRC5株である。これは、ヒトの初期胎由来の繊維芽細胞株である。それらを、FCS 10%、ペニシリン/ストレプトマイシン1%、フンジゾン(fungizone) 1%及びNEAA(可欠アミノ酸) 1% Gibco(登録商標)を含有するグルタマックス(Glutamax) I を有するBME培地(基礎イーグル培地)で培養する。

酢酸中2mg/mlの溶液として用いたコラーゲンは、ラットの後ろの腿由来のI型コラーゲンである。

【0027】

ゲルを得る方法

細胞懸濁液の調製

75-cm²のベトリ皿に得たMRC5 培養物をトリプシン処理した後、FCS 10%と1x10⁶細胞/mlの比率で抗生物質を含有するDMEMに細胞懸濁液を調製し、ゲル当たり500,000個の細胞とする。

混合物の調製は、ゲル化を遅らすために、氷上で行う。

以下のオーダーと比率で、攪拌しながら種々の成分を加える。

【0028】

【表1】

1.76 X DMEM	2.3 ml
I 型コラーゲン	1.5 ml
0.1N NaOH	0.25 ml
FCS	0.45 ml
細胞懸濁液	0.5 ml

【0029】

この十分にホモジナイズした混合物を直径5cmのベトリ皿(バクテリオロジー型

期胎由来の繊維芽細胞株である。それらを、FCS 10%、ペニシリン/ストレプトマイシン1%、フンジゾン 1%及びNEAA(可欠アミノ酸) 1% Gibco(登録商標)を含有するグルタマックス I を有するBME培地(基礎イーグル培地)で培養する。

酢酸中2mg/mlの溶液として用いたコラーゲンは、ラットの後ろの腿由来のI型コラーゲンである。トリチウム標識したコラーゲンは酢酸中0.3mg/mlの溶液とし、その活性は0.06mCi/mlである(Dupont Net-660)。

【0031】

ゲルを得る方法

細胞懸濁液の調製

75-cm²のベトリ皿に得たMRC5 培養物をトリプシン処理した後、FCS 10%と1x10⁶細胞/mlの比率で抗生物質を含有するDMEMに細胞懸濁液を調製する。

混合物の調製は、ゲル化を遅らすために氷上で行う。

以下のオーダーと比率で、攪拌しながら種々の成分を加える。

【0032】

【表2】

2 X DMEM	400 μ l
トリチウム化I 型 コラーゲン	300 μ l
0.1N NaOH	100 μ l
FCS	100 μ l
細胞懸濁液	100 μ l

【0033】

この十分にホモジナイズした混合物200 μ lを24ウエルのプレートに分け、37℃で培養する。放射活性は、0.4 μ Ci/ウエルである。

1時間後、各ウエルに500 μ l のDMEM培地+FCS 3%を入れる。

7日間、24時間ごとに、活性化された潜在性コラーゲナーゼの活性を測定する。

このために、各ウエルから培地500 μ lを除き、液体シンチレーションで計測する。各ウエルにDMEM中25mg/mlのトリプシン/TPCK溶液300 μ lを入れ、37℃で15分培養する。トリプシン作用は、蒸留水中100mg/mlのトリプシン阻害溶液200 μ lを加

えて停止する。培地500 μ lを除き、液体シンチレーションで計測する。500 μ lのDMEM培地+FCS 3%を各ウェルに再度加え、さらに24時間プレートを再び培養する。

I 1844抽出物は、最終濃度が0.1%及び0.5%となるように、ゲルが生じる間に2xDMEM 培地で希釈する。

【0034】

I 1844抽出物は、全コラーゲナーゼ活性を変えない。所定時間で、潜在性コラーゲナーゼの増加が対照と処理試料の両方で経時的に認められるが、潜在性の活性化コラーゲナーゼの対照に対する各比率は変化しない。生成物は、コラーゲナーゼ活性を全く引き起こさない。

本発明による化粧品用組成物の製造において、こうして構成されるI 1844抽出物は、従来の希釈剤、局所使用に適した水性又は非水性の溶媒ならびに実際の組成物の活性成分と混合される。適当な溶媒及び/又は希釈剤は、本発明の抽出物の活性成分を表皮又は真皮の皮膚構造に運ぶ能力に従って選択される。

【0035】

本発明のI 1844抽出物は、遺伝毒性(genotoxicity)が全くないこともAmes及びDNA-修復アッセイで分かった。

その安定性は、化粧品用組成物での使用に適している。

本発明の化粧品用組成物は、組成物の全重量に対し0.00001~5重量%の割合で、皮膚に用いられる化粧品用組成物の製造に一般的に用いられる賦形剤と混合されるI 1844抽出物を含む。

この割合は、組成物に含まれるI 1844抽出物の固有活性の機能として上記の範囲内で変動し得る。

好ましくは、I 1844抽出物は、組成物の全重量に対し0.0001~2重量%の割合で存在する。

本発明の組成物の製造において、I 1844抽出物は、従来の希釈剤及び皮膚での使用に適している水性又は非水性の溶媒、ならびに組成物自体の他の成分と混合される。適当な溶媒及び/又は希釈剤は、皮膚に本発明の活性なI 1844抽出物を沈着させる能力によって選択される。

をマイクログラニューール中の溶解形態又は懸濁形態に含んでいてもよい。

【0038】

本発明の組成物は、混合成分が溶解されているか又はマイクロディスページョン(microdispersion)されているローション又は溶液の形態をとっていてもよい。

したがって、本発明の組成物の形態は、含水液ならびに1以上の適合性の界面活性剤中のマイクロディスページョンであってもよい。分散物は、マイクロエマルジョンの性質、特に透明性及低粘性を示し、実際に本物の溶液の外観を有する。また、それらは、用時調製することができる。

本発明の組成物の1つの有利な形態は、接着性支持体(以降、「パッチ」とする)を介して局部的に用いられる液体で、このパッチは、微電流(microcurrent)のような物理的現象によって任意に活性化される活性成分の流布を制御することができる。

また、本発明の化粧品用組成物は、コラーゲン合成刺激剤、コラーゲナーゼ又はエラスターゼ阻害剤、バソプロテクター、又はケラチノサイト増殖刺激もしくは細胞外マトリクス成分(コラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカン)の合成刺激に寄与する生成物、又はこのタイプの局所組成物に有用な生成物、例えば細胞再生促進剤、コラーゲナーゼ又はエラスターゼ阻害剤、バソプロテクター、ラジカルスカベンジャー、皮膚保護機能回復活性剤(セラミド、必須脂肪酸)又は保湿剤と同じタイプの作用を有する他の活性成分を含むことができる。

【0039】

本発明の組成物は良好な安定性を有しており、成分の沈降又は相分離なしに、又はその使用を妨げる活性を低下せずに、-10~60℃の温度で使用するための必要時間、保存することができる。

これらの組成物は非常に十分な耐性があり、光毒性を示さず、長期間の皮膚への使用によっても副作用を伴わない。

本発明の組成物は、本質において内因性又は外因性(この場合主に化学線の老化)であれ、皮膚の老化を妨げ、かつ/又はそれを防止する製剤として種々の形態で使用することができる。

抗老化目的にデザインされる本発明の化粧品用組成物は、表皮又は毛髪又は軟毛

【0036】

これらの組成物は、一般的に、予定される特定の製剤の必要性にしたがって、局所使用を意図した組成物に一般的に用いられる成分から選択される賦形剤又は添加剤を含む。

それらは、例えば粘稠剤、軟化剤、緩和剤、安定剤、保存剤、消泡剤、界面活性剤、抗酸剤、色素及び/又は顔料及び/又は他のタイプの充填剤、香料、シリコン及び種々の油脂物質を含むことができる。

I 1844抽出物は、つねに組成物の全量に対して0.00001~5重量%、好ましくは0.0001~2重量%(量は、乾燥抽出物量に対して算出)である。

本発明の組成物は、重量/重量%ベースの比率(これは用いられる抽出物の活性の程度、つまり乾燥物質の濃度とこの物質の比活性に依存する)で、新規な株I 1844の発酵汁の抽出物を含むことが好ましい。

本発明の化粧品用組成物を得るには、組成物の全重量に対し0.00001~5重量%、有利には0.0001~2重量%、さらに有利には0.001~2重量%、好ましくは組成物の全重量に対し0.01~2重量%の比率で、全く精製工程なしに発酵から直接得られる粗抽出物を使用するのが適切である。

【0037】

これらの重量割合は、製造した乾燥抽出物の重量をベースにして自然に算出される。

さらに詳しくは、本発明の組成物は、溶解され、番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M.に寄託されているロドトルラ株又はその生産変異体株の発酵で得られる幾らかの量の精製抽出物を、上記のような、この種の発酵に通常用いられる賦形剤とともに含む。

本発明の組成物の形態は、成分又は混合成分が、任意に安定剤を有し、化粧品用組成物に一般的に用いられ、かつ成分に適合する賦形剤(例えばラノリン又は植物、ミネラルもしくは合成油脂)と組み合わせられているエマルジョンであってもよい。

また、本発明の組成物は、適当な賦形剤、例えばセルロースエステル又はアクリル誘導体のような他のゲル化剤中でゲルの形態を生ずることができ、活性成分

系と接触させて、その外観を変え、それらを保護することができる。

皮膚を若く保つには、かたさが本質的な特色であることは周知である。それは、実際に細胞活力の本当のマーカーを成し、その消失は、老化の他の兆候の進行、例えばしわの形成又は目の輝きの喪失を決定づける。

【0040】

真皮がその全体的な密度と弾柔軟性を維持する限りは、依然として表皮も滑らかで柔軟であり、非常に張りがある。皮膚の老化は、青春の盛りに始まる複雑な現象である。原因となるものには、フリーラジカル、遺伝的要因及び日光があるが、それらは多様に変化しやすい。これらの皮膚構造は全てあらゆる段階で影響を及ぼされ、やがて、細胞数が減少する。質の乏しい組織が生じ、その本来のかたさと弾性が失われる。

表皮細胞の代謝が減速し、その基底層がしなやかな形態を失い、かつ直線的になることが認められている。全体的なケラチノサイト数が減退し、この結果角質層がその有効性を失う。さらに、水の蒸発があまり制御されない。また、真皮の主要な細胞を構成する繊維芽細胞の活性が、年月が経つにつれて低下することが認められる。次いで、産出されるコラーゲンは、繊維質で剛性になる。エラスチン合成は、初期ですら低下する。つまり、真皮の性質により肌ざわりが変わり、真皮は薄くなり、崩壊して筋肉の牽引に対する抵抗性を弱める。この遊離がひびわれを生じ、この結果しわができる。

【0041】

再構成を滑らかにする、本発明の化粧品用組成物の処方、全ての段階の皮膚で、かたさの作用を自然なベースに回復させる。

それらは、皮膚のかたさ、弾性及び若々しさを喪失させる、皮膚のわずかなミクロの変態に反応する。

また、本発明の化粧品用組成物は、抗老化ケアのため成熟した皮膚用に意図されている。そこで、I 1844抽出物は皮膚の再構成因子に作用し、この結果、構造(かたさと張り)及び外観(肌ざわりのよさ(comfort)と輝き)又は厚み(かたさと張り)及び表面(輝きと肌ざわりのよさ)双方の生理学的バランスを再構築する。活力を与えるか、又は再構成する本発明の化粧品用組成物は、それぞれ日中及び/又

は夜間に使用することができる。

化粧用組成物は、他の活性な添加剤をも含むことができる。それらは、例えばビタミン又は抗汚染(anti-blemish)剤であってもよい。

【0042】

その比類ない再構成の質は、例えば海洋性プランクトンの抽出物と組み合わせた相乗性によっても補強され、増強される。海洋性プランクトン由来の抽出物によって、皮膚の潤いとかたさを再び最適に確実に引き出すことができる。

また、果物抽出物のような植物刺激物(phytostimulins)、例えばラジカルスカベンジング特性について選択されるリンゴの植物刺激物を使用することができる。それらは、フラボン、ステロール、必須脂肪酸及びビタミンEを含むビタミン類の豊富な、特に活性な新規ラジカルスカベンジャーを構成している。そこで、皮膚は、特に紫外線やストレスによって生じるフリーラジカルの危険性に対して最大限に保護される。

パーフルオロオイルも、本発明の化粧用組成物に使用することができる。さらに、これらのパーフルオロオイルの性質は、粗い部分やざらざらした皮膚のマイクロレリーフ(microrelief)のへこみを滑らかにする。それらは顔の輪郭をならし、本当の若々しさの「かたち」のように皮膚表面を視覚的に粉飾する。

【0043】

したがって、本発明の化粧用組成物は、表皮細胞の取替え及びコラーゲンとエラスチンの産生を刺激し、本来の潤い性を最適に確実に再度誘導し、老化の本質的な要因の1つを成すフリーラジカルに対して皮膚をより完全に保護しえさする。再度機能される表皮は、一旦より良く潤うと、より若く、滑らで、より張りがあるようになる。特に、顔の輪郭は、よりはっきりと張り、皮膚は内側から再構成されて、この結果目に見えて引き締まるであろう。

上記化粧用組成物に含有される1844抽出物は、一体化(unifying)活性剤として皮膚に作用する。

臨床試験は、30〜60代の女性120人について行った。彼女らは、4週間本発明の化粧用組成物の質を試験した。

彼女らの皮膚のかたさ、滑らかさ及び潤いに対する生成物の視覚的な有効性が

ない。

【0046】

実施例1：ロドトルラ株1844由来の抽出物の調製

1.1 発酵

ロドトルラ株1844の発酵を、種々の培養培地で行った。

1.1.1

a) 菌株を、ペトリ皿の継代培養培地で増殖させる。

【0047】

【表3】

サッカロマイセス・セレビジエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)自己溶解物	10 g
トリプトン	10 g
グルコース	20 g
寒天	15 g
精製水 適量	1 l

【0048】

培養物を30℃で48時間インキュベートする。次いで、各ペトリ皿に、以下の組成を有する適切な回収培地10 mlを加えることにより、酵母懸濁液を得る。

【0049】

【表4】

NaCl	9.00 g
KCl	0.42 g
CaCl ₂	0.48 g
NaHCO ₃	0.20 g
グリセロール	150.00 g
3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸(NOPS)	3.00 g
精製水 適量	1 l

、87%で認められた。その主要な化粧の質、例えば使用の容易さ、迅速な浸透、脂肪性のフィルムが全くないこと、ならびに満足度及び快適さは、82%に好まれた。

【0044】

他の臨床研究は、皮膚の休息、マイクロデプレッション(microdepression)的ネットワーク、皮膚の生体力学特性及びその輝きに対する本発明の化粧用組成物の有効性を立証することからなされた。

成熟した皮膚用に特に意図されているラインにより、敏感肌と乾燥肌の毎日のケアで、細かな線とマイクロレリーフが統計的に有意に弱まり、鋭さ(sharpness)とマイクロデプレッション的ネットワークの発生が改善され、ならびに皮膚の張りが改善されることが認められた。

正常かつ混合した皮膚(mixed skin)の日々のケアは、細かな線の統計的に有意な弱化、鋭さとマイクロデプレッション的ネットワークの改善及び皮膚の張りの改善を立証した。

抗しわ/かたさける夜のケアは、深いしわ、細かな線とマイクロレリーフの統計的に有意な弱化、鋭さとマイクロデプレッション的ネットワークの発生を改善、及び皮膚のかたさと張りの改善を示した。

【0045】

再生させる強力なケアは、しわとマイクロレリーフを統計的に著しく弱め、鋭さとマイクロデプレッション的ネットワークの発生を改善することを示した。

これらの様々な臨床結果は、美容術の当業者に周知の種々の方法、例えば潤いを測定できる磁気共鳴イメージング(MRI)マイクロプローブ技術；皮膚の再構成を評価する透過型顕微鏡；皮膚の厚みを測定する高解像超音波検査又は細胞活性を測定するホスホラス(phosphorous)-31スペクトルメトリーによって確認された。

また、本発明の主題は、化粧に用いられる賦形剤中の化粧に有効量の1844抽出物が表皮及び/又は毛髪又は軟毛の系に用いられることを特徴とする、化粧の処法である。

以下の実施例により、本発明を例示するが、これは本発明を例示するものではない。

【0050】

b) この懸濁液5 mlを用い、以下の組成を有する培養培地500 mlを含む2リットルの三角フラスコに接種する。

【0051】

【表5】

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	10 g
ペプトン化したミルク	20 g
コーンステープ(Corn steep)	10 g
グルコース	30 g
微量元素溶液	10 ml
精製水 適量	1 l

【0052】

但し、微量元素溶液は、以下の化合物からなる。

【0053】

【表6】

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1 g
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.025 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g
H ₃ BO ₃	0.56 g
(NH ₄) ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.02 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
精製水 適量	1 l

【0054】

培養物は、150 rpmで攪拌しながら、2リットルの三角フラスコ中で30℃で48時間発育させる。

1.1.2.

a) 二次シードバッチからの酵母懸濁液0.2 mlを用い、以下の組成を有する培養培地100 mlを含む500-mlフラスコに接種する。

【0055】

【表7】

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	20 g
トリプトン	20 g
グルコース	20 g
微量元素溶液	10 ml
精製水 適量	1 l

【0056】

微量元素溶液は、実施例1.1.1に記載のものと同じである。

培養物は、200 rpmで攪拌しながら、30℃で24時間発育させる。

b) 上記で得た培養物100 mlを用い、組成が実施例 1.1.1.bと同一の培地12リットルを含む20リットルの発酵槽に接種し、これに1 ml/lのストロクトール(Struktol(登録商標))を加える。

培養物は、30℃、通気率1 vvmで、攪拌速度を変えて30%の溶存酸素圧を維持しながら発育させる。pHは、アンモニアで5.0に調整する。

25時齢で、成長を保つためにグルコースの濃縮液を加える。

培養を、成長プラトー、32時齢で止める。

1.1.3.+

実施例1.1.2と同様に攪拌した100 mlのフラスコの培養物を調製し、この培養物を用い、以下の組成を有する培養培地12リットルを含む20リットルの発酵槽に接種する。

【0057】

【表8】

培養物を、30℃、通気曝気率1 vvmで、攪拌速度を変えて溶存酸素圧30%を維持しながら発育させる。

pHは、アンモニアで5.5に調整する。30時齢で、成長を保つためにグルコースの濃縮液を加える。

培養を、37時30分齢の成長プラトーで止める。

1.1.5

二次シードバッチからの酵母懸濁液0.75 mlを用い、以下の組成を有する培養培地500 mlを含む2リットルのフラスコ6個それぞれに接種する。

【0061】

【表10】

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	20 g
カゼイン加水分解物	20 g
グルコース	20 g
微量元素	10 ml
精製水 適量	1 l

【0062】

微量元素溶液は、実施例 1.1.1に記載のものと同じである。

培養物は、220 rpmで攪拌しながら、30℃で24時間発育させる。

次いで、6個のフラスコをブールし、以下の組成を有する培地300リットルを含む450リットルの発酵槽に接種する。

【0063】

【表11】

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	20 g
トリプトン	20 g
グルコース	30 g
微量元素溶液	10 ml
ストロクトール	1 ml
精製水 適量	1 l

【0058】

微量元素溶液は、実施例 1.1.1に記載のものと同じである。

培養物を、実施例 1.1.2.bと同様の条件下で発育させる。

31時齢で、成長を保つためにグルコースの濃縮液を加える。34時齢の成長プラトーで培養を止める。

1.1.4

実施例1.1.2.aと同様の組成を有する500 mlの培地を含む、攪拌済みの2リットルのフラスコ培養物4個を調製する。

4個のフラスコを、それぞれ、二次シードバッチからの酵母懸濁液(フラスコ1個当たり0.75 ml)で接種する。培養物を30℃、200 rpmで24時間発育させる。次いで、それらをブールし、以下の組成を有する培地230リットルを含む450リットルの発酵槽に接種する。

【0059】

【表9】

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	30 g
トリプトン	20 g
ロフェロース(Roferose)	30 g
微量元素	10 ml
ストロクトール	1 ml
精製水 適量	1 l

【0060】

微量元素溶液は、実施例 1.1.1に記載のものと同じである。

サッカロマイセス・セレビジエ自己溶解物	30 g
カゼイン加水分解物	20 g
グルコース	20 g
微量元素	10 ml
ストロクトール	1 ml
精製水 適量	1 l

【0064】

微量元素溶液は、実施例 1.1.1に記載のものと同じである。

培養物は、30℃、通気率1 vvmで、攪拌速度を変えて30%に近い溶存酸素圧を維持しながら発育させる。

pHは、アンモニアで5.5に調整する。35時齢で、成長を保つためグルコースの濃縮液を加える。

培養を、40時齢の成長プラトーで止める。

【0065】

1.2 抽出

1.2.1

抽出を、実施例 1.1.1に従って得た9リットルの汁(500 mlの汁を含む2リットルのフラスコ18個)について行った。

9000 rpm (14,000 g) で遠心分離を10分間行い、154 gの湿性バイオマスを得る。

このバイオマスを、一晚攪拌しながら6リットルのジクロロメタン/メタノール(v/v)混合物と室温で接触させる。

次いで、バイオマスをろ過で除き、50℃での真空下、有機層を蒸発乾燥させる。

蒸発残渣(9.8 g)は乾燥抽出物を構成しており、これを112 mlのメタノールに再溶解させる。

こうして得た成分を0.2 μmでろ過し、ケラチノサイト刺激バイオロジカルアッセイで評価する。200倍(1/200)に希釈すると、ケラチノサイトについての刺激指

数(SI)は1.9を示す。

【0066】

1.2.2

実施例1.1.2の培養汁12リットルについて、抽出を行う。

実施例1.2.1と同様のプロトコルに従うが、得られた湿性バイオマス1900 gを、80リットルのジクロロメタン/メタノール (50/50) 混合物で抽出する。つまり、溶媒混合物/湿性バイオマスの割合が、湿性バイオマス1 kg当たり溶媒混合物40リットルに近くなるようにして行う。

一晚接触させた後、バイオマスをろ過で除き、50℃で真空中、有機層を蒸発乾固させる。

93.8 gの乾燥抽出物が得られ、これを375 gの50/50 (v/v) エタノール/水混合物で採取する。

こうして得た0.2 g/gの乾燥抽出物を含む0.2 μmろ過液は、1/200希釈で2.1の刺激指数(SI)を示す。

【0067】

1.2.3

実施例1.1.3からの11リットルの培養物について、抽出を行う。

プロトコルは実施例 1.2.2と同様であり、得られた2.2 kgの湿性バイオマスを、80リットルの50/50 (v/v) ジクロロメタン/メタノール混合物で抽出した。

次いで、ろ過でバイオマスを除き、50℃で真空中、有機層を蒸発乾固させる。

98gの乾燥抽出物が得られ、これを、0.2 g/g含有溶液が得られるように、392gのエタノール/水 (50/50) (v/v) 混合物で採取する。

0.2 μmろ過した後、この溶液をケラチノサイト刺激バイオリジカルアッセイで評価する。1/200の希釈で、刺激指数(SI) 2.8が示される。

【0068】

1.2.4

実施例 1.1.3と同様にして調製した12リットルの培養物について、抽出を行う。しかし、この場合には連続遠心分離を用い、バイオマスを分離する。1.6 kgの湿性バイオマスが、得られる。このバイオマスを、80リットルの50/50 (v/v) ジ

有機層を蒸発させた後、1447 gの乾燥抽出物が得られる。これを13,023 gの50/50 (v/v) エタノール/水混合物で採取し、0.1 gの乾燥抽出物含有溶液を得る。0.2 μmろ過した後、この溶液をケラチノサイト刺激バイオリジカルアッセイで評価する。1/100希釈で、刺激指数(SI)2.6が示される。

以下の実施例において、量は、重量%として示す。

【0071】

実施例2：顔用デイクリーム

【0072】

【表12】

クロロメタン/メタノール混合物で処理する。

一晚接触させた後、ろ過でバイオマスを除き、50℃で真空中、有機層を蒸発乾固させる。

83 gの乾燥抽出物が得られ、これを747 gの50/50 (v/v) エタノール/水混合物で採取し、0.1g/gの乾燥抽出物含有溶液を得る。

得られた溶液を0.2 μmろ過すると、1/100の希釈で刺激指数(SI)3.5が示される。

【0069】

1.2.5

実施例 1.1.3.からの230リットルの培養物について、抽出を行う。連続遠心分離でバイオマスを分離した後、29 kgの湿性バイオマスが得られる。このバイオマス8 kgを、80リットルの50/50 (v/v) ジクロロメタン/メタノール混合物で処理する。つまり、溶媒混合物/湿性バイオマスの割合が、湿性バイオマス1 kg当たり溶媒混合物10リットルに近くなるようにして処理する。

一晚接触させた後、ろ過でバイオマスを除き、50℃で真空中、有機層を蒸発乾固させる。

有機層を蒸発させた後、314 gの乾燥抽出物が得られる。これを2826 gの50/50 (v/v) エタノール/水混合物で採取する。

こうして得られた溶液(0.1 g/gの乾燥抽出物)は、1/100希釈で、刺激指数 (SI) 2.8を示す。

【0070】

1.2.6

実施例 1.1.5からの330リットルの培養物について、抽出を行う。連続遠心分離を用い、54.4 kgの湿性バイオマスを得る。このバイオマス27.7 kgを、272リットルの50/50 (v/v) ジクロロメタン/メタノール混合物で処理する。つまり、溶媒混合物/湿性バイオマスの割合が、湿性バイオマス1kg当たり溶媒混合物5リットルに近くなるようにして処理する。

一晚接触させた後、ろ過でバイオマスを除き、50℃で真空中、有機層を蒸発乾固させる。

カルボマー (CARBONER)	0.15
トリエタノールアミン	0.1
プロピレン グリコール	5
キサンタンガム	0.2
グリセロール	3
グリセリル ステアレート	3
ポリエチレングリコール ステアレート	2
ステアレス (STEARETH)-20	2
オクチルパルミテート	10
セチルアルコール	2
ステアリルアルコール	0.25
パーフルオロオイル	0.2
コレステロール	0.5
合成ろうみつ	5
ジメチコン (DIMETHICONE)	5
海洋性プランクトン抽出物	0.5
リンゴ抽出物	3
ビスボロル (BISABOLOL)	0.5
トコフェリルアセテート	1
ブドウ種子 抽出物	0.5
保存剤	0.8
芳香剤	0.5
I 1844 抽出物	0.1
脱イオン水 適量	100

【0073】

実施例3：顔用ケア濃縮物

【0074】

【表13】

ブチレン グリコール	5
カルボマー	0.2
トリエタノールアミン	1
ポリソルベート-60	0.8
ソルビタンスステアレート	0.6
液体石油ゼリー	2
ラノリン	0.3
【欠文】ジベラルゴネート(DIPELARGONATE)	5
【欠文】トリグリセリド	5
セチルアルコール	0.25
【欠文】ジカプリレート/ジカプレート	5
グリセリル ステアレート	3.00
植物ステロール	0.5
ジメチコン	0.5
ステアリン酸	2
パンテノール	0.5
ヒアルロン酸ナトリウム	0.05
ビサボロール	0.1
トコフェリルアセテート	1
大豆抽出物	0.5
保存剤	0.8
芳香剤	0.5
I 1844 抽出物	0.25
脱イオン水 適量	100

【0075】

実施例4：顔面用液体乳液

【0076】

【表14】

ポリエチレングリコール-32	5
リン酸緩衝液	0.1
ジメチコン コポリオール	5
ポリソルベート-20	0.1
ポリプロピレングリコール	10
海洋性プランクトン抽出物	1
リンゴ抽出物	5
ビサボロール	0.5
トコフェリルアセテート	0.5
小麦タンパク質抽出物	2
保存剤	1
芳香剤	0.3
I 1844 抽出物	0.1
脱イオン水 適量	100

【0079】

実施例6：ゲル

【0080】

【表16】

カルボマー	1
中和剤	0.25
プロピレングリコール	5
パンテノール	1
アロエベラ抽出物	1
ヤグルマソウ抽出物	5
酵母エキス	0.5
小麦抽出物	0.25
ヒアルロン酸ナトリウム	0.01
保存剤	0.7
I 1844 抽出物	0.05
脱イオン水 適量	100

ブチレン グリコール	5
キサンタンガム	0.2
グリセリル ステアレート	1
ポリエチレングリコール ステアレート	1
【欠文】トリグリセリド	5
セチルアルコール	0.5
酸化チタン	1
ジメチコン	3
ポリアクリルアミド	5
セラミド	1
パンテノール	1
ヒアルロン酸ナトリウム	0.05
ビサボロール	0.1
トコフェリルアセテート	1
保存剤	0.7
芳香剤	0.5
I 1844 抽出物	0.15
脱イオン水 適量	100

【0077】

実施例5：ローション

【0078】

【表15】

【0081】

実施例7：クリームパック

【0082】

【表17】

カルボマー	0.5
トリエタノールアミン	0.5
ソルビタンスステアレート	1.5
ポリエチレングリコールステアレート	3
セチルアルコール	5
植物油	20
酸化チタン	0.7
グリセロール	7
トコフェロール	0.75
リンゴ抽出物	3
ビサボロール	0.5
レチニルバルミテート	0.5
ヒアルロン酸ナトリウム	0.02
保存剤	1
芳香	0.3
I 1844 抽出物	0.1
色素	
脱イオン水 適量	100

【0083】

実施例8：洗い落とせるパック

【0084】

【表18】

アクリルコポリマー	1
トリエタノールアミン	1
グリセロール	15
C14-C16 オレフィンシルボネート	5
ポリエチレングリコールエーテルおよび 〔欠文〕ココエート(COCOATE)	2
海洋性プランクトン抽出物	1
リンゴ抽出物	5
大豆抽出物	0.5
〔欠文〕アスコルビルホスフェート	3
シルクタンパク質抽出物	2
保存剤	0.8
芳香剤	0.5
I 1844 抽出物	0.15
脱イオン水 適量	100

6に記載の方法で得られる請求項7に記載の組成物。

【請求項9】 刺激指数SIが1.2～6の、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を示すことを特徴とする請求項7に記載の組成物。

【請求項10】 バイオマスの抽出、溶媒と水の蒸発、及び化粧での使用に適した溶媒中での乾燥抽出物の希釈で得られることを特徴とする請求項7～9の1つに記載の組成物。

【請求項11】 皮膚の老化を防止する化粧用組成物を製造するための、微生物の発酵で得られる、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する化合物の使用。

【請求項12】 化合物が、酵母の発酵で得られることを特徴とする、請求項11に記載の使用。

【請求項13】 化合物が、ロドトルラ株、特に番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M. に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体を用いて得られることを特徴とする請求項12に記載の使用。

【請求項14】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する化合物を製造するための、ロドトルラ株、特に番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M. に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体の使用。

【請求項15】 化粧で用いる賦形剤中の、微生物の発酵で得られる、IL-6産生に刺激活性を有する化合物の化粧に有効な量が表皮に用いられることを特徴とする化粧の処法。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年3月13日(2000. 3. 13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化粧製品用賦形剤と混合され、微生物の発酵で得られる生成物である、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物を含有する化粧用組成物。

【請求項2】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、酵母の発酵で得られる生成物であることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、ロドトルラ菌株の発酵で得られることを特徴とする請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出物が、番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M. に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002又はその生産変異体の発酵で得られることを特徴とする請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 番号I 1844でパスツール研究所のC.N.C.M. に寄託されているロドトルラ株SEBR 2002及びその生産変異体。

【請求項6】 発酵汁中でケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性が得られるまで、請求項5に記載の株が従来の条件下で発酵培地で培養されることを特徴とする、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する抽出生成物を製造する方法。

【請求項7】 請求項6に記載の方法で得られる、ケラチノサイトによるIL-6産生に刺激活性を有する組成物。

【請求項8】 バイオマスが、未改質形態又は濃縮形態で用いられる請求項

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ベレーロ, ジャンーマリ

フランス、エフー31120 ボルテ シェル

ガロンヌ、リュ デ ミモザ、9

Fターム(参考) 4B065 AA78X AC12 AC14 BA22

BC03 BD16 CA24 CA50

4C083 AA031 AA032 AA072 AA082

AA112 AA122 AB242 AB282

AC012 AC032 AC072 AC112

AC122 AC182 AC242 AC352

AC402 AC422 AC442 AC542

AC642 AC792 AD042 AD072

AD092 AD152 AD162 AD332

AD352 AD412 AD452 AD492

AD512 AD532 AD622 AD642

AD662 BB51 CC01 CC04

CC05 CC07 DD23 DD27 DD31

DD41 EE12 EE13 FF01

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 99/00220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 9510 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-070208 XP002088375 "Cosmetic material-contains collagenase inhibitor and controls reduction of dermal collagen and loss of skin elasticity" A see abstract & JP 06 345636 A (NONOGAWA SHOJI YG) 20 December 1994</p>	1,12,16
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 194 (C-0938), 11 May 1992 & JP 04 029916 A (SHISEIDO CO LTD), 31 January 1992 see abstract</p>	1,12,16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 1999

Date of mailing of the international search report

07/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Beys, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 99/00220

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 335 554 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NY (NL)) 4 October 1989 see claim 1 ---	1,12,16
A	MOLLER A ET AL: "Regulation of monocyte and keratinocyte interleukin 6 production by transforming growth factor beta." EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, (1994 DEC) 3 (6) 314-20. JOURNAL CODE: 806. ISSN: 0906-6705., XP002088374 Denmark ---	1,12,16
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 072 (C-570), 17 February 1989 & JP 63 264513 A (LION CORP), 1 November 1988 see abstract -----	1-4,12, 13,16

1

Form PCT/BA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 99/00220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0335554 A	04-10-1989	AT 77937 T	15-07-1992
		CA 1325598 A	28-12-1993
		GR 3005864 T	07-06-1993
		JP 1287013 A	17-11-1989
		JP 1770969 C	30-06-1993
		JP 4060567 B	28-09-1992
		US 5037643 A	06-08-1991

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)